

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 59-148798

(43)Date of publication of application : 25.08.1984

(51)Int.Cl. C07H 21/02

C07H 21/04

(21)Application number : 58-022516

(71)Applicant : WAKUNAGA SEIYAKU KK

(22)Date of filing : 14.02.1983

(72)Inventor : MIYOSHI KENICHI  
SUZUKI MASANORI  
FUWA TORU

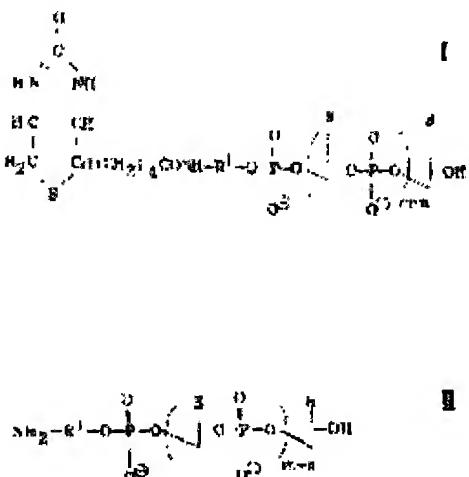
## (54) BIOTIN NUCLEOTIDE DERIVATIVE AND ITS PREPARATION

### (57)Abstract:

**NEW MATERIAL:** A compound of formula I (m, n are 0, optional natural number; R<sub>1</sub> is divalent straight-chain or branched hydrocarbon residue; B is base constituting nucleotides).

**USE:** Biochemical reagent for determination of antigen density per cell, radioimmunoassay and enzyme immunoassay.

**PREPARATION:** For example, biotin is linked by allowing an activated ester of biotin, e.g., succinimide-ester to act on the amino group of an oligonucleotide derivative of formula II (a primary amino group is introduced via group R<sub>1</sub> to 5'-terminal phosphoric acid group of oligodeoxynucleotide).



① 日本国特許庁 (JP)  
 ② 公開特許公報 (A)

① 特許出願公開  
 昭59—148798

③ Int. Cl.  
 C 07 H. 21/02  
 21/04

識別記号  
 厅内整理番号  
 7252—4C  
 7252—4C

④ 公開 昭和59年(1984)8月25日  
 発明の数 2  
 審査請求 未請求

(全 10 頁)

⑤ ピオチンスクレオチド誘導体およびその製造法

⑥ 特 願 昭58—22516  
 ⑦ 出 願 昭58(1983)2月14日  
 ⑧ 発明者 三好健一  
 広島県高田郡甲田町下甲立1624  
 湧永製薬株式会社中央研究所内  
 ⑨ 発明者 鈴木正則

広島県高田郡甲田町下甲立1624  
 湧永製薬株式会社中央研究所内

⑩ 発明者 不破亨  
 広島県高田郡甲田町下甲立1624  
 湧永製薬株式会社中央研究所内  
 ⑪ 出願人 湧永製薬株式会社  
 大阪市福島区福島三丁目1番39  
 号  
 ⑫ 代理人 弁理士 猪股清 外3名

明細書

1. 発明の名称 ピオチンスクレオチド誘導体  
 およびその製造法

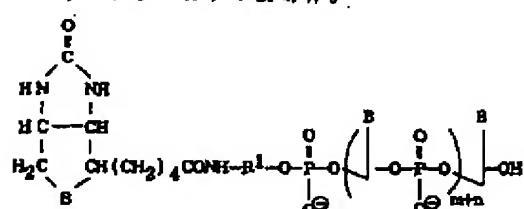
それらは同一でも異をつてもよい。)。

2. 基本 B がアミン、チミン、シトシンおよび  
 グアニンからなる群より選ばれたものである、  
 特許請求の範囲第1項記載のピオチンスクレオ  
 チド誘導体。

3. R<sup>1</sup> が炭素数2~20の直鎖または分岐鎖のアル  
 キレン基である、特許請求の範囲第1項または  
 第2項記載のピオチンスクレオチド誘導体。

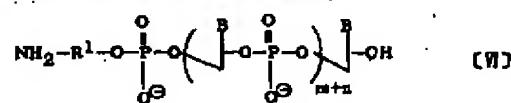
4. n が0または6までの自然数、m が0または  
 40までの自然数である、特許請求の範囲第1~  
 3項のいずれか一項に記載のピオチンスクレオ  
 チド誘導体。

5. 下式 [W] で示されるオリゴスクレオチド誘導  
 体の末端アミノ基にピオチンを結合させて下式  
 [W'] で示されるビオチン-オリゴスクレオチド  
 を得ることを特徴とする、ピオチン  
 スクレオチド誘導体の製造法。



[W]

〔ただし、n および m はそれぞれ0または任意  
 の自然数であり、R<sup>1</sup> は2個の直鎖または分岐鎖  
 の炭化水素基であり、B はスクレオチドを構  
 成する塩基である (B が複数個存在するときは、



[W']

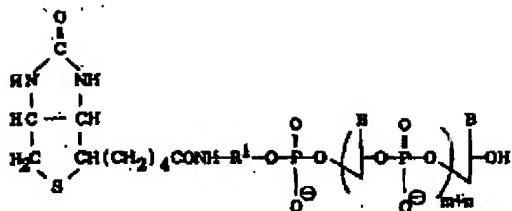
## 発明の背景

## 技術分野

本発明は、一般に、ビオチンスクレオチド誘導体に関する。さらに具体的には、本発明は、スクレオチドの塩基以外の部分にビオチンを結合させてなるビオチンスクレオチド誘導体に関する。本発明は、また、このようなビオチンスクレオチド誘導体の製造法にも関する。

## 先行技術

ビオチンはビタミンB複合体の一つであつてビタミンHとも呼ばれ、多くの動植物の生育に必要な物質である。一方、ビオチンは卵白中のアビシンと強力に相互作用を行なうことが知られており、その点に着目してビオチンをその誘導体の形で利用するものとしてたとえばビオチン-アビシン試薬がある。これは、細胞あたりの抗原密度の測定、ラジオイムノアッセイおよびエンザイムイムノアッセイ等の生化学試薬として応用されている。また、ビオチンと核酸とを結合させた、感染および遺伝疾患の診断用DNAプローブが開発され(Press,



【図】

6. アミノ基とビオチンとの結合をアミノ基とビオチン活性エステルとの反応によつて行なう、特許請求の範囲第5項記載の方法。
7. ビオチン活性エステルがビオチンスクレオチドまたはビオチン-ペラニトロフェニルエステルである、特許請求の範囲第6項記載の方法。
8. アミノ基とビオチンとの結合を縮合剤の作用下に行なう、特許請求の範囲第5項記載の製造法。
9. 緩合剤がシンクロヘキシルカルボゾイミドである、特許請求の範囲第8項記載の製造法。

## 3. 発明の詳細な説明

Netl. Acad. Sci. USA 78, 6633-6637 (1981)）、市販化されるに至つている。このDNAプローブにおける、ビオチンスクレオチド誘導体の製造は、シテジントリホスファート(dCTP)のビオチン誘導体をシテジントリホスファートの代わりに使用して酵素的にDNAあるいはRNAを合成にして行なつたものである。

しかし、本発明者らの知るところによれば、このようにして製造されるビオチンスクレオチド誘導体には下記のような問題点がある。

- イ、スクレオチドの塩基部分にビオチンを含有するため使用オリゴスクレオチド固有の融解温度(Tm値)に変化を生じる。
- ロ、シトシン誘導体の合成が困難である（上記文献より）。
- ハ、任意かつ定められた塩基配列をもつDNAの合成が困難である。

これらの理由によつて、現段階でのビオチン-スクレオチド誘導体は、その応用範囲が狭く、有用性が限定されているのが現状である。

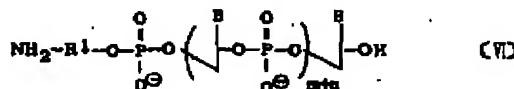
## 発明の概要

## 要旨

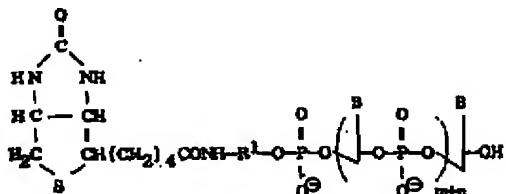
本発明は上記の点に解決を与えることを目的とし、特定のオリゴデオキシリボスクレオチドのスクレオチド塩基以外の特定部位にビオチンを結合させてなるビオチンスクレオチド誘導体によつてこの目的を達成しようとするものである。

従つて、本発明によるビオチンスクレオチド誘導体は下式【V】で示されるビオチン-オリゴデオキシリボスクレオチドであること、を特徴とするものである。

また、本発明によるビオチンスクレオチド誘導体の製造法は、下式【VI】で示されるオリゴスクレオチド誘導体の末端アミノ基にビオチンを結合させて下式【V】で示されるビオチン-オリゴデオキシリボスクレオチドを得ること、を特徴とするものである。



特開昭59-148738 (3)



【図】

[ただし、 $\alpha$ および $\beta$ はそれぞれ0または任意の自然数であり、 $R^1$ は2個の直鎖または分枝鎖の炭化水素基であり、 $B$ はヌクレオチドを構成する塩基である( $\beta$ が複数個存在するときは、それらは同一でも異なるつてもよい)。]

#### 結果

本発明者らの合成したピオテン-オリゴヌクレオチド類似物質は、前記検査用非放射性アフィニティプローブの經所を回避することができて、下記のような長所をもつものである。

イ、ヌクレオチドの塩基部分にピオテンを含有しないので触媒濃度(加熱)に変化を生じることなく安定である。

ロ、いかなる塩基配列をもピオテン-オリゴヌクレオチドも合成可能である。

ハ、プローブとして短鎖オリゴマーで十分である。

ニ、合成が非常に簡単であつて、大量合成が可能である。

ホ、プライマー(脱酸合成分のDNA断片)としても利用できる。

このような長所があるところから、本発明によればピオテンヌクレオチド類似体の利用方法の拡大も考えられる。すなわち、例えば、ピオテン-オリゴヌクレオチドは非放射性検査用アフィニティプローブとして、あるいはプライマーとして利用可能であることは既記したところであつて、その検出方法も抗体による比輝、酵素の活性測定、アピジン-セファロースによるアフィニティカラム選択性色体による可視化等々、多様であり、また放射性プローブ( $^{32}P$ )に比べて被曝の危険、コスト、薬剤物の処理および保存性等の点で有利である。

#### 発明の具体的説明

##### ピオテンヌクレオチド類似体【Ⅰ】

本発明によるピオテンヌクレオチド類似体は、前記の式【Ⅰ】で示されるものである。

式中、記号 $B$ は、2'-デオキシリボヌクレオ

シドの2'-および3'-水酸基を除いたデオキシリボヌクレオシド残基を示すのに慣用されてゐるものであつて、具体的には下記の構造のものである。



置換基 $B$ はヌクレオチドを構成する塩基を示し、通常はアデニン、チミン、シトシンまたはグアニンである。化合物【Ⅰ】中に $B$ が複数個存在するときは、それらは同一でも異なるつてもよい。

$\alpha$ および $\beta$ は、それぞれ0または自然数を示す。本発明ピオテンオリゴヌクレオチド類似体の重合度が $\alpha+\beta$ で表示されているのは、本発明の新しい構造法で重合度がそれぞれ $\alpha$ および $\beta$ のフ

クションを結合させていることによるものである(詳細後記)。その場合の $\alpha$ は実用的には0~6、特に1~4、 $\beta$ は実用的には0~40、特に0~20、である。

若 $R^1$ は、化合物【Ⅳ】の核酸部分とピオテン部分とを連結する二価の直鎖または分枝鎖の炭化水素基である。これは、特に炭素数2~20程度の直鎖または分枝鎖のアルキレン基が適当である。好ましい $R^1$ は、炭素数2~6のアルキレン基である。

##### 化合物【Ⅳ】の合成

###### 一般的説明

化合物【Ⅳ】、すなわち本発明によるピオテンヌクレオチド類似体、は合目的的な任意の方法によつて合成することができます。

一つの好ましい方法は、前記の式【Ⅰ】のオリゴヌクレオチド類似体、すなわちオリゴヌクレオチドの2'-尿嘧啶基に基團 $R^1$ を介して一级アミノ基が導入されたもの、のアミノ基にピオテンを結合させることからなるものである。

一方、式【Ⅳ】の化合物は、オリゴヌクレオチド

の合成および生成オリゴスクレオチドの5'-水酸基紙長上で的一般アミノ基の導入からなる方法で合成することができる。

第1図は、この好ましい合成法の一例を示すフローチャートである。フローチャート中の記号は、下記の意味を持つ（その意味ないし詳細は、後記した通りである）。

R<sup>0</sup> リン酸基を保護する保護基であつて、通常オルトクロロフェニル基が用いられる。

R<sup>1</sup> 二価の炭化水素基である。

R<sup>2</sup> 5'-末端水酸基の保護基であつて、通常ジメトキシトリアル基が用いられる。

R<sup>3</sup> 他のすべての保護基が安定な条件で容易に脱離されて、リン酸リエスナルを与えることができる直換基であつて、通常シアノエチル基が用いられる。

R<sup>4</sup> アミノ基の保護基であつて、通常トリフルオロアセチル基が用いられる。

n 0より小さい任意の自然数。

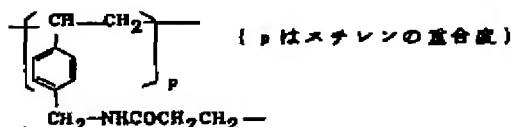
m 0または任意の自然数。

n 0および任意の自然数。

B 塩基を示す。

B' 保護された塩基を示すが、通常はN<sup>6</sup>-ベンジルアデニン、N-イソブチリルグアニン、N<sup>6</sup>-ベンジルシトシンおよびチミン（すなわち、保護不變）より選択される。

～④スペーサーを介した組合であつて、通常は下記のものである。



BIOT<sup>3</sup> ビオチン活性エステル

#### 化合物[V]の合成

一般にオリゴスクレオチド合成法としては、トリエスチル法、ホスマイト法およびそれぞれの固相法および液相法がある。本発明者らは既に固相法によるオリゴスクレオチドを確立しており、化合物[V]の合成には本発明者らの下記の方法が

好ましい。

Tetrahedron Letters 1979, 3635 (1979)  
Nucleic Acids Research 8, 5473 (1980)  
Nucleic Acids Research 8, 5491 (1980)  
Nucleic Acids Research 8, 5507 (1980)  
Nucleic Acids Research Symposium Series  
7, 281 (1980)

また、上記で合成したオリゴスクレオチドの5'-水酸基にリン酸基を介して一般アミノ基を導入する方法すなわち、化合物[V]の合成法としては、たとえば本発明者らの特願昭57-138136 号明細書記載の方法がある。

化合物[V]の合成法をその一実施形態について示せば、下記の通りである。すなわち、第1図に示したように、化合物[I]の保護基R<sup>3</sup>を除去したものと化合物[I]の保護基R<sup>2</sup>を除去したものとを結合させ、これらの操作をくり返すことによつて、化合物[V]を合成する。オリゴスクレオチド化合物[I]の合成法は、上記の通り公知である。

一方、本発明者らの方法（特願昭57-138136

号明細書参照）に従つて、式[V]の化合物を合成する。すなわち、化合物[I]のR<sup>2</sup>を除去して5'-水酸基化合物とし、これにリン酸化剤（たとえば、ホスホジトリアソリF、ホスホジクロリドまたはホスホベンジトリアソリド等）を作用させてリン酸化し、ついでアミノ基が保護されているアミノアルコール化合物R<sup>2</sup>-NH-R<sup>1</sup>-OH（この化合物はオメガ-アミノアルコール（NH<sub>2</sub>-R<sup>1</sup>-OH）のアミノ基をR<sup>2</sup>で保護することにより得ることができる）を結合させることにより、化合物[V]を得ることができる（詳細は該明細書参照）。

この化合物[V]の保護基R<sup>3</sup>を除去し、化合物[I]の保護基R<sup>2</sup>を除去したものとを結合させて、化合物[V]を合成する。結合は、化合物[I]の合成の際の結合と本質的には変わらない方法で行なうことができる。

このようにして合成された化合物[V]の保護基をすべて除去すれば、化合物[V]が得られる。保護基COR<sup>4</sup>基、リン酸トリエスチル中のオルト-クロロフェニル基および塩基部分のアシル基は、

0.5Mのナトラメタルアニオン-ピオテン-2-カルボアルドキシムのジオキサン-水(9:1, v/v)浴液で処理後、アルカリ処理(緩アノモニア水)を行なうことにより除去される。R<sup>4</sup>がトリフルオロアセチル基の場合は、アンモニア処理により充分脱離されるが、オルトニトロフェニルスルfonyl基である場合はメルカプトエタノール処理が必須である。R<sup>4</sup>として他の保護基を用いた場合は、オリゴスカレオナド部分が不安定な条件で、さらに別の処理を加えるとともに可能である。なお、デオキシオリゴリボヌクレオナドの合成法は既に各種のものが公知であつて、保護基の種類およびその導入ないし除去ならびに結合その他のについて上記以外の詳説は核酸の化学合成に関する成書や論説たとえば「メクレオシア・スクレオナドの合成」(丸善1977年)、「核酸有機化学」(化学同人1979年)、「核酸」(昭文社1979年)、*Tetrahedron*, 34, 3143(1978)、有機化、34, 723(1978)および化学の領域、33, 566(1979)等を参照することができる。

たはその活性エステルである。

このような意味でのアミノ基とピオテンとの結合を行なわせる一つの好ましい方法は、アミノ基とピオテン活性エステルとの反応によることからなるものである。ピオテン活性エステルが好ましいのは、一般に、オリゴスカレオナドの保護部分のアミノ基とは反応しないで5'-水酸基末端上の第一級アミノ基とのみ選択的に反応し、しかも反応操作が簡便だからである。「ピオテン活性エステル」とは他の官能基(通常アミノ基)と反応しやすいエステル結合を持つピオテン誘導体を意味し、具体的にはスクシンイミド、パラニトロフェニル-、ベンゾトリップソリド-、2,4,5-トリクロロフェニル-エステル等がある。前二者が好ましい。

アミノ基とピオテンとの結合を行なわせる他の好ましい方法の一つは、両者の結合を総合剤の存在下に行なうことからなるものである。総合剤として適当なもの例を挙げれば、ジシクロヘキシカルボジイミド、カルボニルイミダゾール、ウツ

#### 化合物[別]の合成

ピオテン-オリゴデオキシリボヌクレオチド(化合物[別])は、上記化合物(V)の5'-末端長上の第一級アミノ基にピオテンを結合させることによって得ることができる。

両者の結合はピオテンのカルボキシル基と化合物(V)のアミノ基との間の脱水によるアミド結合の形成を実現することのできる任意の方法によつて行なうことができる。化合物(V)中にピオテンのカルボキシル基との反応が可能なアミノ基または水酸基が存在するときは、それらを適当に保護した状態でこの反応を行なうことができる。従つて、本発明で「式(V)で示されるオリゴスカレオナド誘導体の末端アミノ基にピオテンを結合させて式[別]で示されるピオテン-オリゴメタレオナドを得る」という表現は、化合物[別]がこのように保護されている場合をも包含するものである。また、この表現は、ピオテンがその複数的誘導体の形にある場合をも包含するものである。ピオテンの複数的誘導体の具体例は、その成ハライドを

Pワード試験"R"等がある。ジシクロヘキシカルボジイミドが好ましい。

いずれの方法による場合にも、反応方法は合目的的な任意のものであります。所与の反応基に対する具体的な反応方法は、後記実験例および各種の成書、たとえば、「ペプチド合成」(丸善1975年)および「タンパク質の化学」(1977年)を参照して適当に定めればよい。

#### 実験例

##### 1) フローティート

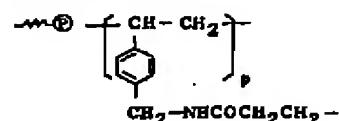
第2回のフローティートに従つて、本発明化合物(同回の化合物(D))を製造した。

第2回で、記号は次の意味を持つ。

D' ベンゾイル化アデニン

B アデニン

DMT: ジメトキシトリテル



R<sup>0</sup> オルトクロロフエニル

B1 エチル

CE - シアノエチル

m 2

n' 2

n 12

## 2) 化合物【M】(第2回の④)の合成

## 実験 1-1

ジメトキシトリチルアミノシン／樹脂【①】(樹脂は粗体に過ぎないが、樹脂に担持された目的化合物は外観的には樹脂そのものと変わらないので、樹脂に担持された旨該化合物を以下において単に樹脂と呼ぶことにする) 300mg (0.033mmol) をイソプロパノール-塩化メテレン (15 : 85, V/V) 溶液 10ml で 3 回洗浄、臭化亜鉛の 1.0M のイソプロパノール-塩化メテレン溶液 8ml で 5 分間ずつ 4 回反応 (脱トリチル化洗浄) 樹脂【①】を得る。樹脂【①】をイソプロパノール-塩化メテレン溶液 10ml で 3 回洗浄し、これにジスクレオチド【③】 150mg (0.1mmol) のピリジン溶液

を添加後、共沸させて系を無水とし、メジテレンスルホニルエトロトリアゾリド (以下 MSNT と記す) 150mg (0.5mmol) と無水ビリジン 2ml とを添加して 90 分間反応 (結合) させる。反応後、ビリジン 10ml で 3 回洗浄し、粗雑量 (約 10mg) のジメチルアミノピリジン (以下 DMAP) を含む無水酢酸-ピリジン (1 : 9, (V/V)) 溶液 10ml を添加し 10 分間反応させて末反応 S'-水酸基をアセチル化して保護し、これをピリジンで洗浄して、化合物【④】 (n = 2) を得る。以上のような操作を 6 回くり返して、化合物【④】 (n = 12) を得る。

一方、5'-ヒドロキシ-ジスクレオチド【⑤】 800mg (0.71mmol) とオルトクロロフエニル-ホスホジトリアゾリトとを前者のジオキサン溶液 (1.0mmol, 6 ml) 中で 2 時間反応させ、続いてトリフルオロアセチル-6-アミノヘキサノール 300mg (1.4mmol) および 1-メチル-イミダゾール 115mg (1.4mmol) を加えてさらに 2 時間反応させる。反応終了後、溶媒を除去し、残渣をクロロホルムに溶解した後、水、0.5M リン酸二水

素ナトリウム水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および 5% の塩化ナトリウム水溶液でそれぞれ洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥する。クロロホルム層を濃縮後、シリカゲルカラムで精製 (溶出液として 0~4% のメタノール含有クロロホルムを使用) し、溶出液を濃縮後ベンタノン中に漬下し粉末状の化合物【⑥】を得る。

上記で合成した化合物【④】 (n = 12) 116mg、(3.45 mmol) を前述と同様の方法で脱トリチル化したもの【⑦】に、化合物【⑥】 60mg (0.04mmol) をトリエチルアミノ-ピリジン-水 (1 : 3 : 1, V/V) 溶液 3ml で処理 (脱シアノエチル化) した化合物【⑧】を加え、無水にしたのち、MSNT 60mg (0.2mmol) および ピリジン 1ml を加え 90 分間反応 (結合) させ、反応終了後 ピリジンおよびメタノールで洗浄し、乾燥して、完全に保護されたオリゴスクレオチド誘導体【⑨】を得る。

オリゴスクレオチド誘導体【⑨】 15mg を 0.5M テトラメチルアムジン-ピリジン-2-カルボアルアミドメイトのジオキサン-水 (9 : 1,

(V/V) 溶液 200ml を加え、遠心管中、室温で 24 時間反応させる。反応後、純アンモニア水 (2.5 ml) を加えて密閉し、50°C で一夜反応させる。反応終了後、戸漏し、戸液を濃縮後、水に溶解させてからエーテルで抽出を行なう。水層を濃縮後、セファデックス G-50 (φ1.5×120cm、溶出液は 0.05M の重炭酸トリエチルアンモニウム緩衝液 pH 7.5) で脱塩精製しベンタノアザエニル保護導体【⑩】を得た。

また同様の方法で実験 1-2、1-3 および 1-4 のようなオリゴスクレオチド誘導体を得た。以上で合成した化合物を第 1 表に示す。

第 1 表

序 号	化 合 物 の 内 容	
	m+n	(B) <sub>m+n</sub> B
1-1	14	A A A A A A A A A A A A A A A A
1-2	14	T T T T T T T T T T T T T T T T
1-3	14	G G A T G C A T G A C C C A C C
1-4	16	A A T C T G G T G A G A A G C G C

特開昭59-148798(7)

上記実験1-2、1-3および1-4で合成した化合物〔⑥〕についても実験2-1と同様な操作を行なつて各々について化合物〔⑦〕を製造する。また、反応の比較のため5'-水酸基をもつ化合物〔⑧〕をも製造し、化合物〔⑨〕とビオチン活性エステルとを各々反応させる。このときの実験を各々実験2-2、2-3および2-4とした。

実験2で製造した化合物を第2表に示す。

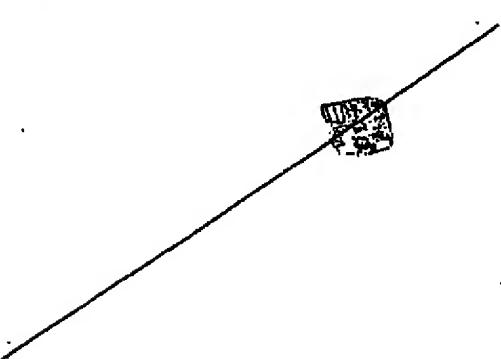
ただし、この表でAはアデニン、Tはチミン、Gはシアニン、Cはシトシンを示す。

これら4種の化合物の高濃度液体クロマトグラフィーの結果を第3回に示す。A-Dは、それぞれ実験1-1～1-4の化合物についての図である。

3)ビオチン-ペントアデニル酸〔⑩〕の製造  
実験2-1

上記実験1-1で合成したペントアデニル酸固体〔⑨〕約1.0ODを0.1M炭酸水素ナトリウム水溶液(pH8.3)10mlに溶解し、ビオチントクシンイミドエステルのジメチルホルムアミド溶液10ml(数百倍過剰に相当)を加えて4℃で一夜または温浴で4時間反応させて、ビオチン-ペントアデニル酸〔⑩〕を合成する。

反応の確認は、高濃度液体クロマトグラフィーおよび20%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で行なつた。またその際、反応性の比較のため上記で合成したオリゴヌクレオチド〔①〕を脱保護して得た5'-水酸基をもつ化合物〔③〕も同様にビオチントクシンイミドエステルと反応させる。



化合物②の内訳	化合物①の内訳					
	(B)1, B	1	2	3	4	5
A	12	14	14	14	14	14
B	12	12	12	12	12	12
C	2-1	2-2	2-3	2-4		
D						
説明	脱保護後 脱離基					

ただし、この表でAはアデニン、Tはチミン、Gはシアニン、Cはシトシンを示す。

以上の結果を第4および5回(高濃度液体クロマトグラフィーの結果)および第6および7回(電気泳動の結果)に示す。

第4回は高濃度液体クロマトグラフィーの導出パターンを示すものである。図中1は何れも反応前の化合物そのものの、2は何れもビオチンと化合物を混合したもの、3は何れも化合物とビオチン活性エステルとを反応させたもののクロマトグラムである。イは実験2-1で式〔⑩〕の化合物、ロは実験1-1で式〔⑨〕である化合物、ハは実験2-2で式〔⑩〕である化合物、ニは実験1-2で式〔⑩〕である化合物について上記のような操作を行なつた際のクロマトグラムを示す。各ピーク上の数字は保持時間を示す。

第5回は高濃度液体クロマトグラフィーの導出パターンを示すものである。図中の1は何れも反応前の化合物そのものの、2は何れもビオチンと化合物を混合したもの、3は何れも化合物とビオ

テン活性エステルとを反応させたもののクロマトグラムである。ホは実験2～3で式(6)の化合物、トは実験1～3で式(6)である化合物、トは実験2～4で式(6)の化合物の、チは実験1～4で式(6)の化合物について上記のような操作を行なつた際のクロマトグラムを示す。なお、ピーカ上の数値は保持時間である。

第6図は電気泳動の結果を示すものである。(a)、(c)、(e)および(f)は、各々実験2～2の(6)、1～3の(6)、2～1の(6)および1～1の(6)の化合物の結果を示す。また、(b)、(d)、(f)および(h)は各々実験2～2の(6)、1～2の(6)、2～1の(6)および1～1の(6)の各々の化合物とビオテン活性エステルとを反応させた後の結果を示す。XCはキシレンシンアノールの、BPBはプロモフェノールブルーのバンドをそれぞれ示しとともに電気泳動の標識として用いるものである。なお図中で上がマイナス側、下がプラス側を示す。

第7図は電気泳動の結果を示すものである。(a)、(c)、(e)および(f)は各々実験1～4の(6)、2～4

の(6)、1～3の(6)および2～3の(6)の化合物の結果を示す。また、(b)、(d)、(f)および(h)は各々実験1～4の(6)、2～4の(6)、1～3の(6)および2～3の(6)の各々の化合物とビオテン活性エステルとを反応させた後の結果を示す。BPBは上記と同じ意味、また図中で上がマイナス側、下がプラス側を示す。

高速液体クロマトグラフィーによる結果(第4図および5図)からみれば、式(6)で示される5'-水酸基をもつ化合物(第4図イ～1、第4図ハ～1、第5図ホ～1および第5図ト～1)はビオテンと反応せず(第4図イ～3、第4図ハ～3、第5図ホ～3、および第5図ト～3)、開始單一ピーカのままである。それに対してオリゴスクレオチド誘導体(式(6))はビオテンと反応させると、高速液体クロマトグラフィーの溶出パターンに変化が生じて、原料のピーカ(第4図ロ～1、第4図ニ～1、第5図ヘ～1および第5図チ～1)はなくなりつており、ビオテン活性エステルと反応して新しい化合物(第4図ロ～3、第4図ニ～3、第5

図ヘ～3および第5図チ～3)ができるていることがわかる。なお、第4～5図ロ、ニ、ヘおよびチの2はビオテン活性エステルと化合物(6)とを混合し、第4～5図イ、ハ、ホおよびトの2はビオテン活性エステルと5'-水酸基をもつ化合物(6)とを混合して実験に行なつた反応の前後の溶出パターンと対比させたものであるが、これらを見比べてみても一级アミノ基を有する化合物(6)はビオテン活性エステルと選択的に反応し、5'-水酸基をもつ化合物(6)とは反応していないことがわかる。

一方第6図および第7図の電気泳動の結果から、5'-水酸基化合物とビオテン活性エステルとの反応を見ると(6)～(b)、(6)～(f)、(6)～(l)および(6)～(b)参照)、反応前(6)、(6)～(f)、(6)～(l)および(6)～(b)のバンドの位置と反応後(6)、(6)～(f)、(6)～(l)および(6)～(b)のバンドの位置に相違が見られないことより、ビオテンとの反応は生じていないことがわかる。また、一级アミノ基を有するオリゴスクレオチド(6)～(d)、(6)～(b)、(6)～(l)および(6)～(b)参照)とビオテン活

性エステルとの反応を見ると、反応前(6)～(d)、(6)～(b)および(6)～(l)のバンドの位置と反応後(6)～(d)、(6)～(b)および(6)～(l)のバンドの位置とが異なつておき、ビオテンと反応していることがわかる。

以上の結果より、上記で合成した一级アミノ基を有する化合物は、ビオテン活性エステルと選択的に反応していることがわかる。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の化合物を合成する方法の一例を示すフローチャートである。

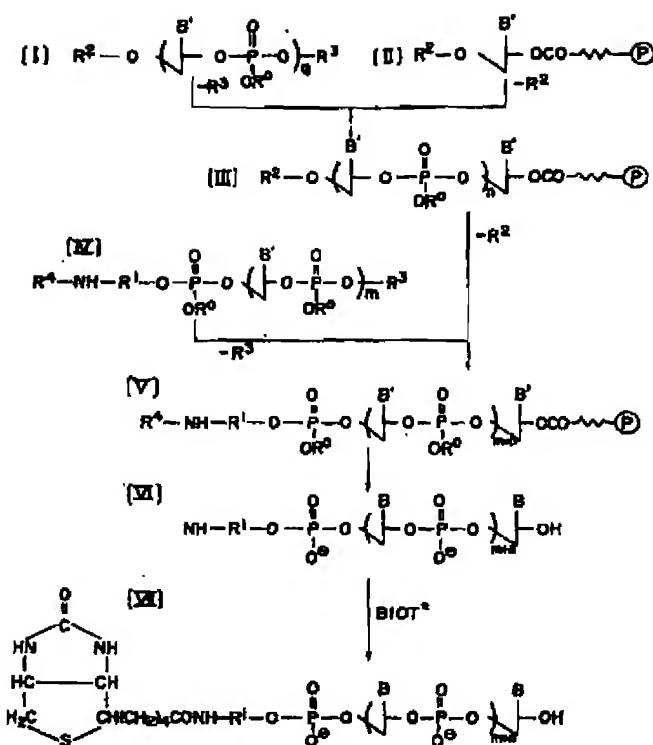
第2図は、実験例で示した本発明化合物の製造法のフローチャートである。

第3図A～Dは、実験例で示した化合物(6)の高速液体クロマトグラフィーの結果を示す図である。

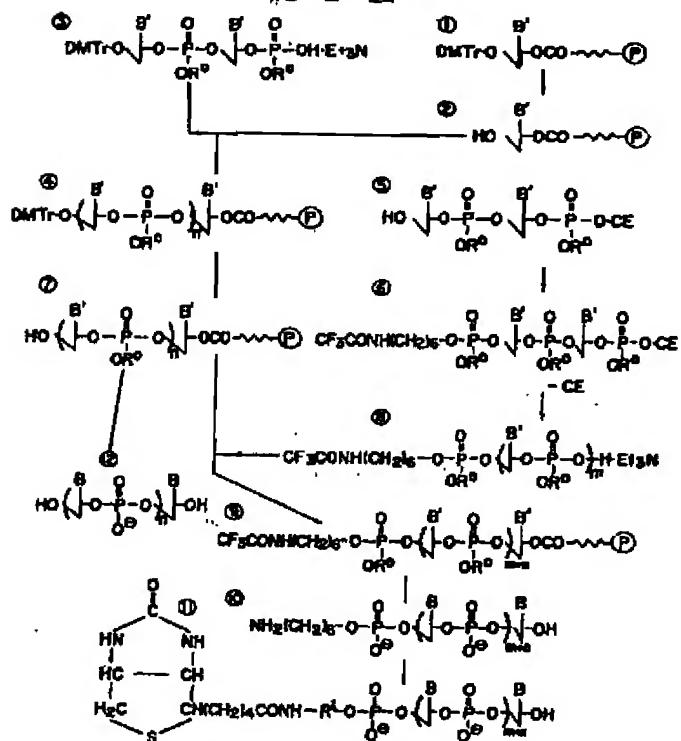
第4～5図は、いずれも高速液体クロマトグラフィーの溶出パターンを示す図である。

第6～7図は、いずれも電気泳動の結果を示す図である。

## 75-1 図

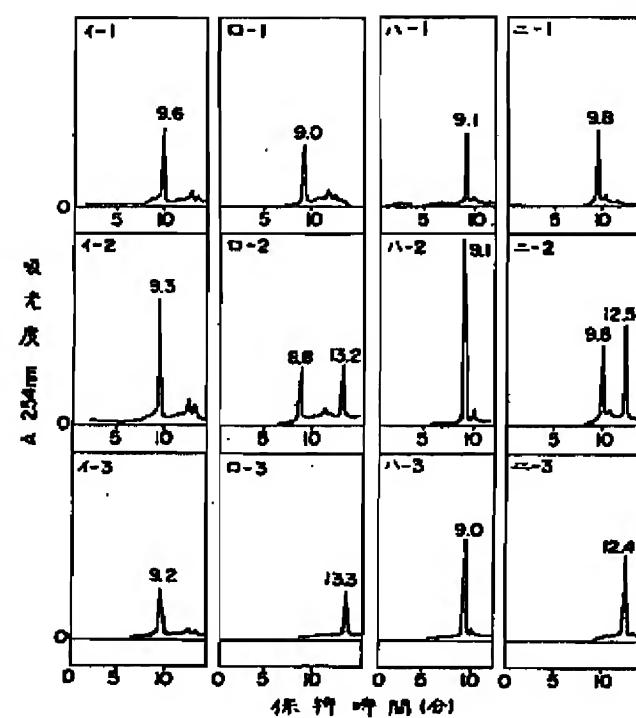
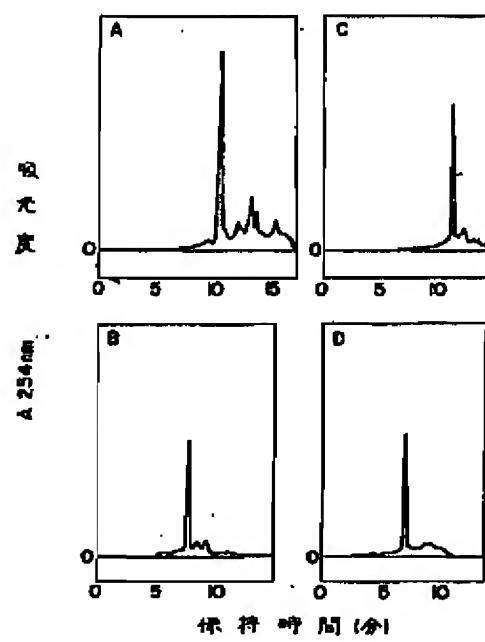


## 75-2 図



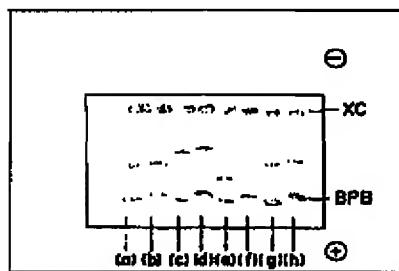
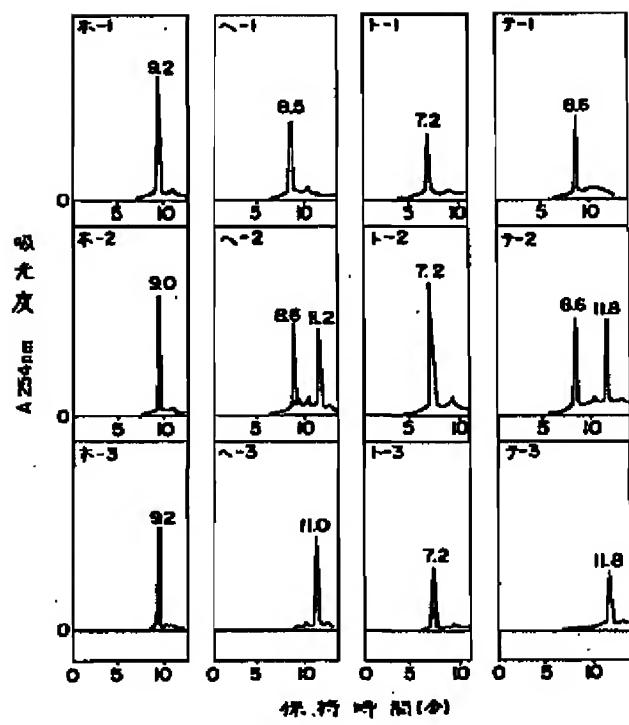
第4図

第3図

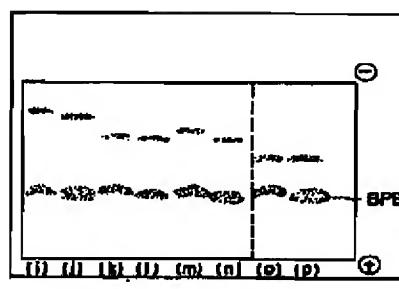


第5図

第6図



第7図



平成 1.12. -4 発行

特許改正書

平成 1 年 8 月 2 日

特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

昭和 58 年特許願第 22510 号(特開昭 59-144798 号、昭和 59 年 8 月 25 日発行 公開特許公報 59-1448 号掲載)については特許法第 17 条の 2 の規定による補正があるので下記のとおり掲載する。 (1)

Int. C.I.	識別記号	庁内整理番号
C07B 21/02 21/04		7417-4C 7417-4C

特許庁長官 吉田文雄

1 事件の表示 昭和 58 年特許願第 22510 号

2 発明の名称 ピオテンスクレオチド誘導体

3 補正をする者 事件との関係 特許出願人  
株式会社

4 代理人(郵便番号 100)  
東京都千代田区丸の内三丁目 2 番 3 号  
(電話東京 (211)2321 大代表)

8426弁理士 佐藤一

5 補正命令の日付 発送日 平成 年 月 日

6 補正により減少する発明の数 1

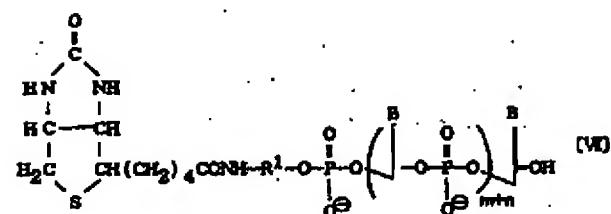
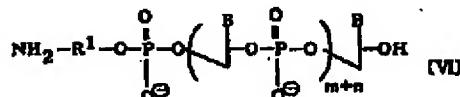
7 補正の対象

明細書の「発明の名称」、「特許請求の範囲」及び「発明の詳細な説明」の各項、並びに図面の第 1 図、及び第 2 図

B. 補正の内容

- (1) 発明の名称「ピオテンスクレオチド誘導体およびその製造法」を「ピオテンスクレオチド誘導体」に補正する。
- (2) 特許請求の範囲を別紙の通り補正する。
- (3) 明細書第 4 頁 6 ~ 8 行の「本発明は、……にも関する。」を削除する。
- (4) 図書第 5 頁 6 ~ 7 行の「RNA を酵剤にして」を「RNA に取り込ませて」に補正する。
- (5) 同書第 6 頁 12 行 ~ 最終行の「また、…… [VI]」を削除する。
- (6) 同書第 8 頁下から 6 ~ 5 行の「アフィニティカラム蛍光性染色体による」を「アフィニティカラム、蛍光性染色による」に補正する。
- (7) 同書第 10 頁下から 6 行の「一つの好ましい方法は、」と「前記の式 [VI]」の間に下記の内容を挿入する。  
「下式 (VI) で示されるオリゴスクレオチド誘導体の末端アミノ基にピオテンを結合させて下式 (VII) で示されるピオテン-オリゴデオキシリボ

メクレオチドを得ること、を特徴とするものである。



[ただし、m や n はそれぞれ 0 または任意の自然数であり、R<sup>1</sup> は 2 個の直鎖または分岐鎖の炭化水素類基であり、B はスクレオチドを構成する塩基である (B が複数個存在するときは、それらは同一でも異なってもよい)。]

すなわち、この方法は、】

- (1) 図書第 13 頁 3 ~ 6 行の各行の「Research」を「Research」に補正する。

(9) 同書第14頁下から2行の「COR<sup>4</sup>基」を「CO-~~~④基」に補正する。

(10) 同書第21頁最終行の「アルドキシメイト」を「アルドキシム」に補正する。

(11) 同書第23頁最終行の「と反応させる。」を「と反応させる（対照実験3-1）。」に補正する。

(12) 同書第24頁3行の「を製造する。」を「を製造する。これをそれぞれ実験2-2、2-3および2-4とした。」に補正する。

(13) 同書第24頁第5行の「をも製造し、」を「を用い、」に補正する。

(14) 同書第24頁7行の「実験2-2、2-3および2-4」を「実験3-2、3-3および3-4」に補正する。

(15) 同書第24頁8行の「実験2で製造した」を「実験2および3で使用した」に補正する。

(16) 同書第25頁の第2表を次のとおり補正する。

「 第 2 表

調 査 試 験 例	化合物③の内容		調 査 試 験 例	化合物④の内容	
	④	(B) <sub>n</sub> B		④	(B) <sub>m+n</sub> B
3-1	12	AAAAAAAAAAAAAA	2-1	14	AAAAAAAAGAAAAA
3-2	12	TTTTTTTTTTTT	2-2	14	TTTTTTTTTTTTT
3-3	12	ATCGATCGACACAC	2-3	14	GGATCCATGACCAAC
3-4	14	TCTGTGACACACAC	2-4	16	ATTCCTGATGACACAC

(17) 同書第26頁8～9行の「ビオチンと化合物を」を「反応前の試料を」に補正する。

(18) 同書第26頁9～10行の「化合物とビオチン活性エステルとを反応させたものの」を「ビオチン活性エステルと反応させた後の」に補正する。

(19) 同書第26頁11行の「実験2-1」を「実験3-1」に補正する。

(20) 同書第26頁12行の「実験1-1」を「実験2-1」に補正する。

(21) 同書第26頁13行の「2-2……実験」

-2で」を「3-2……実験2-2で」に補正する。

(22) 同書第26頁14～15行の「上記のような操作を行なった際」を削除する。

(23) 同書第26頁下から4行～第27頁2行の「第5図は……クロマトグラムである。」を「第5図は同じく高速液体クロマトグラフィーの検出パターンを示し、」に補正する。

(24) 同書第27頁2行の「実験2-3」を「実験3-3」に補正する。

(25) 同書第27頁3行の「実験1-3」を「実験2-3」に補正する。

(26) 同書第27頁4行の「2-4で……実験1-4で」を「3-4で……実験2-4」に補正する。

(27) 同書第27頁5～6行の「上記のような操作を行なった際」を削除する。

(28) 同書第27頁9～10行の「実験2-2の④、1-2の」を「実験3-2の④、2-2の」に補正する。

(29) 同書第27頁10～11行の「2-1の……化合物」を「3-1の④および2-1の④の反応前の化合物」に補正する。

(30) 同書第27頁12行の「実験2-2……、2-1」を「実験3-2の④、2-2の④、3-1」に補正する。

(31) 同書第27頁13行の「1-1の」を「2-1の」に補正する。

(32) 同書第27頁最終行の「実験1-4の④、2-4」を「実験2-4の④、3-4」に補正する。

(33) 同書第28頁1～2行の「1-3の……化合物」を「2-3の④および3-3の④の反応前の化合物」に補正する。

(34) 同書第28頁3～4行の「実験1-4……および2-3」を「実験2-4の④、3-4の④、2-3の④および3-3」に補正する。

(35) 同書第29頁2～11行の「なお、第4～5図……ことがわかる。」を「なお、中間の高速

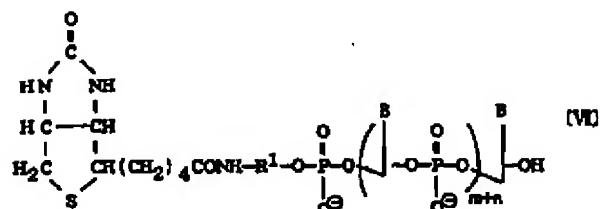
平成 1.12.-4 発行

液体クロマトグラフィーのパターンでは、保持時間の差異を明確にするため、反応の前後の化合物を混合し抽出パターンと対比させたものである。」に補正する。

(38) 図面の第1図および第2図を別紙のとおり補正する。

特許請求の範囲

1. 下式 [W] で示されるビオチン・オリゴデオキシリボヌクレオチドであることを特徴とする、ビオチンヌクレオチド誘導体。



【ただし、mおよびnはそれぞれ0または任意の自然数であり、R<sup>1</sup>は2個の直鎖または分岐鎖の炭化水素基であり、Bはヌクレオチドを構成する塩基である（Bが複数個存在するときは、それらは同一でも異なってもよい）。】

2. 塩基Bがアデニン、チミン、シトシンおよびグアニンからなる群より選ばれたものである、特許請求の範囲第1項記載のビオチンヌクレオチ

ド誘導体。

3. R<sup>1</sup>が炭素数2～20の直鎖または分岐鎖のアルキレン基である、特許請求の範囲第1項または第2項記載のビオチンヌクレオチド誘導体。

4. mが0またはらまでの自然数、nが0または40までの自然数である、特許請求の範囲第1～3項のいずれか一項に記載のビオチンヌクレオチド誘導体。

図 2

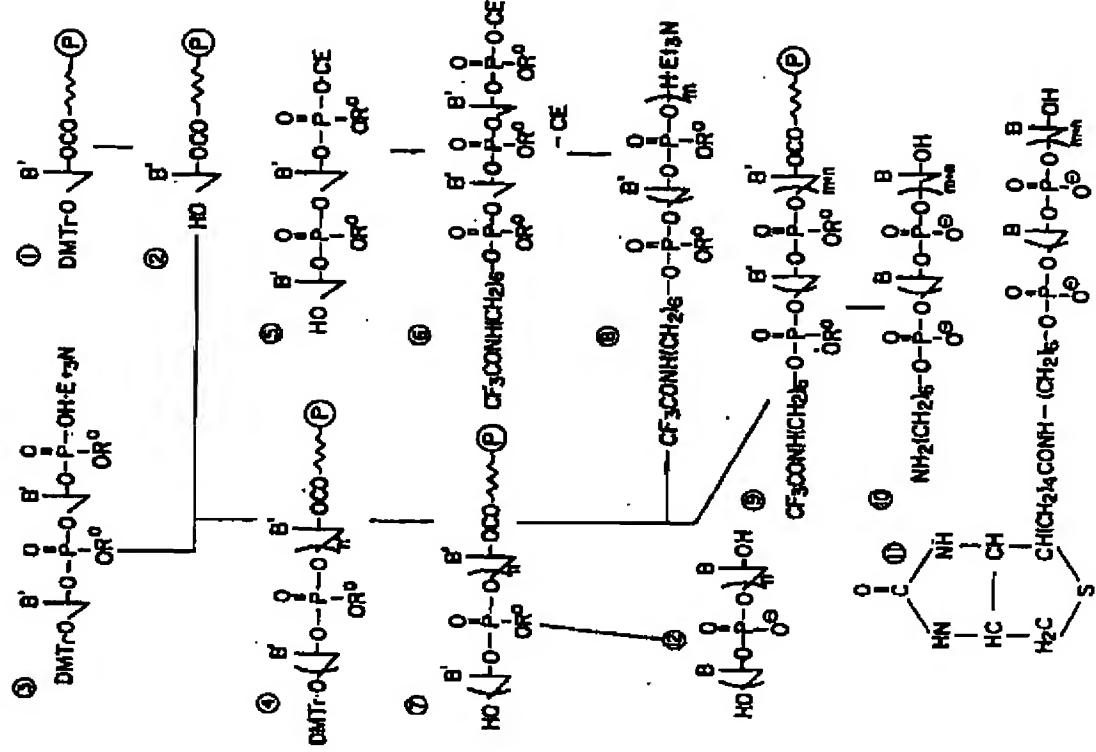


図 1

